PESQUISA DE POLISSACARÍDEOS NO ESPERMATÓFORO DE *DRYMAEUS PAPYRACEUS* (MAWE, 1823)

(MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA) *

(Com 4 figuras)

P. D. Lanzieri
H. E. B. Rezende
Escola de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

A literatura referente à estrutura dos espermatóforos, na grande maioria, diz respeito aos espermatóforos de *Cephalopoda*. Fretter & Graham (1964) detalham espermatóforos dêste grupo, referindo-se apenas a citações de autores que assinalaram o encontro destas estruturas em moluscos terrestres. Desde os nossos primeiros trabalhos, vínhamos encontrando estas estruturas em diversas espécies: *Bulimulus corumbaensis* Pilsbry, 1897 e *Drymaeus papyraceus* Mawe, 1823, sem entrar em maiores detalhes.

Imbuídos da intenção de contribuição para um melhor conhecimento dos espermatóforos em moluscos terrestres, realizamos o presente trabalho, onde fazemos um estudo particularizado destas estruturas, dando ênfase principalmente à sua constituição histoquímica.

Os esfermatóforos em *Drymaeus papyraceus* estão sempre localizados no canal da espermateca e se apresentam como estruturas alongadas (0,6mm), com uma das extremidades afiladas (fig. 1). Conforme já tivemos oportunidade de citar em trabalho anterior (Rezende, 1967), o espermatóforo representa um "cartucho" que encerra espermatozóides. O "cartucho" é formado por substância amorfa e eosinófila. A parede dêste "cartucho" é constituída de uma parte externa, amorfa, fracamente eosinófila, e outra interna ligeiramente mais espêssa, também amorfa, porém de disposição laminar concêntrica, com maior afinidade aos corantes ácidos. Esta última parte apresenta em tôda extensão, num dos lados, um espessamento que faz saliência internamente (fig. 2). Além dêste aspecto, a cavidade do espermatóforo está subdividida por finos septos unidos à porção interna da cápsula que delimitam lojas ocupadas por espermatozóides e, de permeio com êstes, há material em forma de placas, fracamente basófilas (figs. 3 e 4).

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho, coletamos exemplares de *Drymaeus papyraceus* na área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Êstes exemplares foram fixados em Bouin (mod. seg. Dubosq-Brazil, 1905), formol a 10% e formol-cálcio. Além dêstes fixadores, usamos ainda o fixador mencionado por Lillie, 1954 e fixador segundo Mota et al., 1956, indicados por Pearse, 1960 para mucopolissacarídeos e mucoproteínas. As inclusões foram feitas em parafina segundo a técnica usual. Os cortes foram efetuados com a espessura de 5 micra e corados pela Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Gomori 1950). Para o estudo histoquímico foram utilizadas as seguintes técnicas:

1) Ácido periódico Schiff (P.A.S.) segundo McManus de acôrdo com Santa Rosa, 1961.

2) Bloqueio pela acetilação, conforme McManus e Cason, 1950, seguido do P.A.S.

3) P.A.S. após ação da amilase como indicado por Santa Rosa, 1961.

4) Tripsina seguida do P.A.S., segundo Pearse, 1960.

(*) Trabalho realizado no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

5) Ferro coloidal de Müller-Mowry (modificado de MOWRY, (1958), conforme SANTA ROSA, 1961.

6) P. A. S. seguido do ferro coloidal de MÜLLER-MOWRY.

7) Metacromasia tamponada de Azul de Toluidina em pH 7,0, 5,6 e 3,4 (segundo LANDSMEER, 1951) de acôrdo com SASSO, 1961.

8) Azul de Toluidina em pH 5,6 após os processos de metilação e saponificação, segundo SPICER & LILLIE, 1959.

9) Azur I em pH 3,5 e 1,5 (modificado de SPICER, 1960) como indicado por SANTA ROSA, 1961.

10) Azur I em pH 3,5 após os processos de metilação e saponificação.

11) Alcian Blue em pH 2,5 segundo LISON, 1960.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelos métodos anteriormente citados, estão resumidamente mostrados no quadro I, onde os valôres de 1a 3 correspondem à intensidade da côr visualmente estimada. Os símbolos: — significa reação negativa; ± reação fracamente positiva e + reação positiva .

Pela técnica do P. A. S. observamos forte positividade na porção interna da parede e nos septos (lamelas), enquanto que a porção externa da parede mostrou reação fracamente positiva. Após o emprêgo do teste de acetilação, tôdas as estruturas anteriormente positivas ao método do P. A. S. mostraram-se negativas. O teste da saliva não trouxe quaisquer alterações às substâncias de reação P.A.S. positivas, o mesmo acontecendo após o uso de tripsina. A reação positiva, obtida pelo método do P.A.S,. indica-nos a presença de grupamentos glicol 1-2, desde que o teste de acetilação promova um bloqueio dêstes grupamentos. Em vista da hipótese da presença de glicogênio ter sido eliminada (pelo teste da saliva), e também a de mucopolissacarídeos neutros (que após o teste da tripsina daria reação P. A. S. positiva de menor intensidade), concluímos segundo LEBLON et al., 1957, *in* PEARSE, 1960, que estaríamos diante de mucoproteínas ou glicoproteínas, não esquecendo também a ausência de lipídios reveláveis pelo Sudan Black B. Segundo BALBONI, 1954 citado por Santa Rosa, 1960, o material com estas características é mucoproteína. No entanto MAYER'S, 1955, citado por CURRAN, 1964, declara não ser possível a diferenciação histoquímica entre glicoproteína e mucoproteína.

As demais técnicas empregadas, destinadas à evidenciação de polissacarídeos contendo radicais ácidos, mostraram-se em todos os casos com resultados positivos, com exceção para o Alcian Blue em pH 2,5, cujo resultado negativo em várias tentativas assim se manteve. Acreditamos que êste fato esteja provàvelmente ligado à natureza do polissacarídeo.

Com o método de Müller-Mowry, a porção externa da parede (cuja reação frente ao método do P. A. S. já assinalamos ser fracamente positiva) apresentou áreas de reação negativa e outras áreas de reação fracamente positiva. Já nas lojas o material na forma de pequenas placas irregulares ou grânulos apresentou reação fortemente positiva ao método de Müller-Mowry. Desde que o método de Müller-Mowry só nos indica a presença de polissacarídeos ácidos e para estabelecermos se esta positividade se devia a grupos carboxila, sulfato ou fosfato, procedemos à realização do teste da metacromasia utilizando o Azul de Toluidina em diferentes concentrações hidrogeniônicas. Em alguns casos a metacromasia pelo Azul de Toluidina foi controlada por intermédio da metilação e metilação-saponificação. Por êsse método pudemos notar reação positivá frente ao Azul de Toluidina em pH 7,0 e pH 5,6. Esta positividade mostrou grau de intensidade semelhante ao observado no método de Müller-Mowry. Desde que a metilação bloqueou a reação positiva do Azul de Toluidina em pH 5,6, e considerando-se que a saponificação permitiu positividade à metacromasia, podemos concluir que o material em apreço é um polissacarídeo com radical carboxila. Isto ainda é confirmado pelo fato de que o material apresentou metacromasia em pH 7,0 o que não aconteceu em pH 3,4.

Utilizando ainda o Azur I verificamos, em concordância com os resultados obtidos com o Azul de Toluidina, que o material na realidade é um polissacarídeo ácido carboxilado, em vista de ter apresentado reação metacromática frente ao Azur I em

pH 3,5 o que não aconteceu em pH 1,5. Segundo SPICER, 1962 *in* Curran, 1964, a metacromasia em pH 1,5 indica a presença de mucina sulfatada enquanto que a metacromasia em pH 3,0 e ausente em pH 1,5 indica a presença de sialomucinas, mucinas ácidas não sulfatadas com grupos carboxila fortemente dissociados ou mucinas sulfatadas com ésteres sulfato parcialmente mascarados. A possibilidade da existência de sialomucinas é excluída pelo fato de que tais áreas apresentam reação negativa ao método do P.A.S. Da mesma forma não se trata de mucinas sulfatadas com ésteres sulfato parcialmente mascarados em vista da metilação ter abolido tôda a metacromasia (SPICER, 1960).

A extremidade afilada do espermatóforo, de estrutura maciça, mostra como detalhe particular a presença de mucopolissacarídeo ácido carboxilado tanto na porção externa quanto na porção interna de permeio com o material glicoproteico ou mucoproteico. Êste último aspecto também é notado no espessamento longitudinal da porção interna da parede.

CONCLUSÃO

Os testes histoquímicos realizados permitem-nos concluir que os espermatóforos de *Drymaeus papyraceus* Mawe, 1823 encerram dois tipos de polissacarídeos, sendo um dêles uma glicoproteína ou mucoproteína e o outro um mocopolissacarídeo ácido carboxilado.

RESUMO

Os autores fazem um estudo morfológico e histoquímico do espermatóforo de *Drymaeus papyraceus* Mawe, 1823. Pelas técnicas histoquímicas para polissacarídeos evidenciaram a presença de mucoproteína ou glicoproteína e de mucopolissacarídeos ácidos carboxilado.

A presença de mucoproteína ou glicoproteína foi constatada ùnicamente na parede e septos do espermatóforo. Os mucopolissacarídeos ácidos carboxilados foram evidenciados tanto na parede do espermatóforo, misturado com material mucoproteico ou glicoproteico, como também na forma de pequenas massas de permeio com os espermatozóides que ocupam as lojas.

BIBLIOGRAFIA

CURRAN, R. C., 1964 — The Histochemistry of Mucopolysacharides. Inst. Rev. Cyt. 17:149-212

FRETTER, V. & GRAHAM, A., 1964 — Reproduction in Wilburg, K. M. e Yonge, C. M., 1964. Psysiology of Mollusca (1):127-164.

GOMORI, G., 1950 — Trichromic Stain. Amer. J. Clin. Path. 20:661 pp.

LANZIERI, P. D. & REZENDE, H. E. B., 1965 — Estudos anatômicos e histológicos, principalmente do aparelho genital de **Bulimulus corumbaensis** Pilsbry **(Gastropoda. Pulmonata, Bulimulidae).** Mem. Inst. Osw. Cruz 63:179-205, 134 figs.

LISON, L., 1960 — Histochimie et cytochimie animales, principles et méthodes. 3éme ed. Paris, Gauthier-Villars.

MCMANUS, J. F. A. & CASON, J. E., 1950 — Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques I. Periodic acid methods. J. Exp. Med. 91: 651.

PEARSE, A. G. E., 1960 — Histochemistry-Theoretical and Applied 2nd ed. 998 pp. J. A. Cruhchill, London.

REZENDE, H. E. B., 1967 — Contribuição ao conhecimento dos bulimulideos, especialmente de **Drymaeus papyraceus** Mawe, 1823. **(Gastropoda, Pulmonata).** Tese. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 86 pp., 50 figs.

SANTA ROSA, G. L., 1961 — Aspectos histoquímicos da secreção tubária. Tese. Rio de Janeiro, 63 pp.

SASSO, W. S., 1961 — Estudo dos mucopolissacarídeos da zona pellucida dos óvulos de animais de laboratório dos gêneros: **Lepus, Cebus, Canis, Felis (Felis), Cavia. Mus** e **Rattus (Mamalia).** Maternidade e Infância. (Arquivos Médico-Sociais), 20(40):345-407.

SPICER, S. S. & LILLIE, R. D., 1959 — Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. J. Histochem. Cytochem. Baltimore, 7(2):123-125.

QUADRO I

Resultados das pesquisas de polissacarídeos no espermatóforo de **Drymaeus papyraceus** Mawe, 1823.

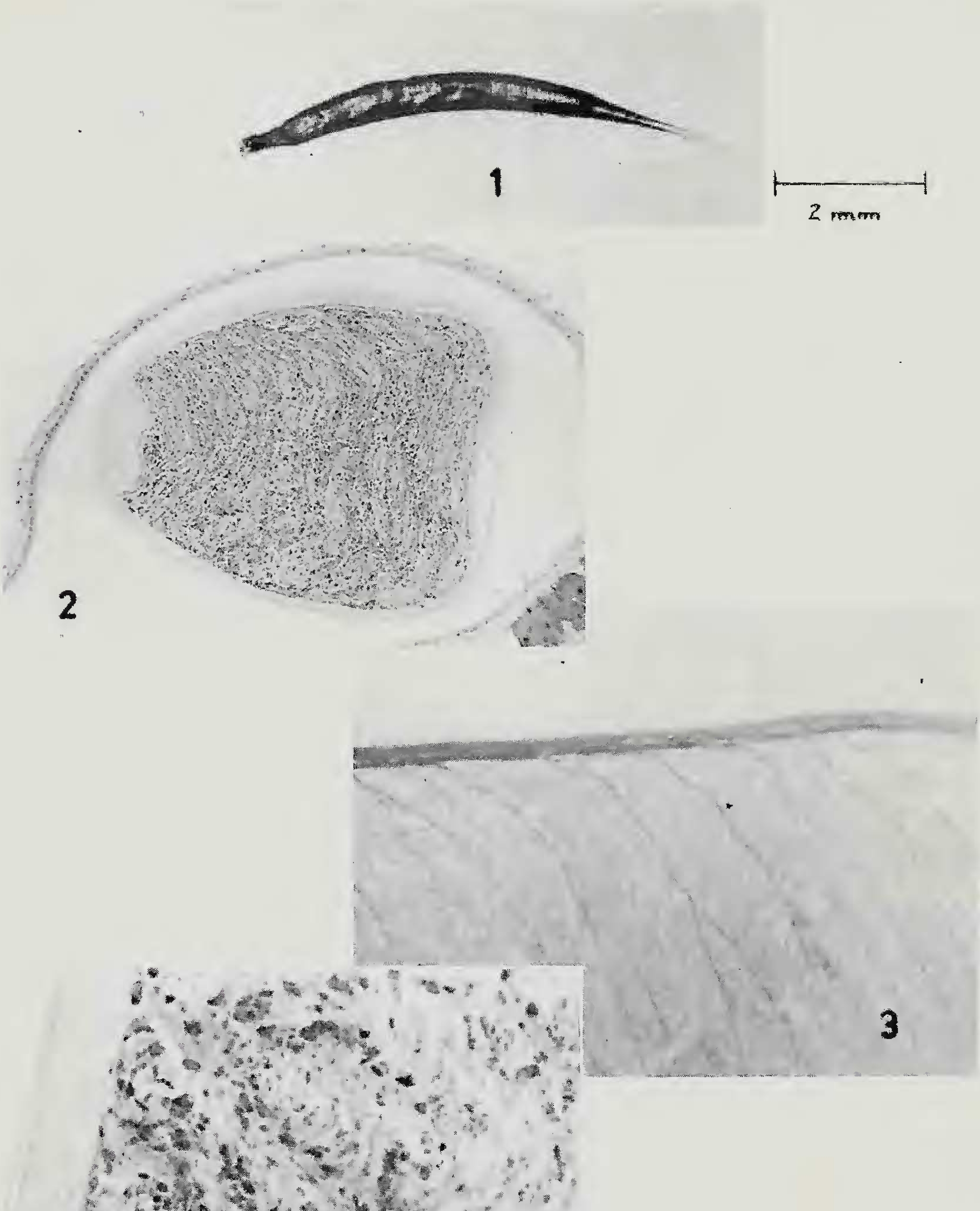
MÉTODOS	PE	PI	S	P
P.A.S.	±	+ 3	+ 3	—
Acetilação + P.A.S.	—	—	—	—
Amilase + P.A.S.	±	+ 3	+ 3	—
Tripsina + P.A.S.	± e —	+ 3	+ 3	—
Müller-Mowry	— e ±	—	—	+ 3
Azul Toluidina pH 7,0	± e —	—	—	+ 3
Azul Toluidina pH 5,6	± e —	—	—	+ 3
Metacromasia + Azul Toluidina pH 5,6	—	—	—	—
Metacromasia + Saponificação + Azul Toluidina pH 5,6	± e —	—	—	+ 3
Azul Toluidina pH 3,4	—	—	—	—
Azur I pH 3,5	± e —	—	—	+ 3
Metacromasia + Azur I pH 3.5	—	—	—	—
Metacromasia + Saponificação + Azur I pH 3,5	± e —	—	—	+ 3
Azur I pH 1,5	—	—	—	—
Alcian Blue pH 2,5	—	—	—	—

PE — porção externa da parede.

PI — porção interna da perede.

S — septos.

P — placas das lojas, situadas de permeio com os espermatozóides.



Drymaeus papyraceus (Mawe, 1823) - Fig. 1 - Espermatóforo; Fig. 2 - Corte transversal do espermatóforo dentro do canal da espermateca. Observar as duas partes que constituem a parede da cápsula, bem como o espessamento longitudinal que faz saliência interna. Col. Hemateina-Astrablau-Eosina. Oc. 10X, ob. 6X, Wild M 20; Fig. 3 - Corte transversal. A cavidade do espermatóforo está subdividida em lojas por finos septos unidos à parede interna e repletos de espermatozóides e material amorfo. Col. Hemateina-Astrablau-Eosina. Oc. 10X. ob. 40X, Wild. M 20; Fig. 4 - Corte transversal. Notar a parte interna da parede do espermatóforo formada por lâminas concêntricas de material amorfo. No interior, espermatozóides e material na forma de placas. Col. Hemateina-Astrablau-Eosina. Oc. 10X, ob. 40X, Wild, M 20.